

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-118699

(43)公開日 平成9年(1997)5月6日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/76			C 07 K 14/76	
A 61 K 38/00	AGA		A 61 K 47/48	Z
38/43			C 07 H 15/04	F
47/48			C 07 K 14/52	
C 07 H 15/04			A 61 K 37/02	AGA
				審査請求 有 請求項の数 7 OL (全 12 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-231212	(71)出願人	390031462
(62)分割の表示	特願平7-137708の分割		株式会社ディ・ディ・エス研究所
(22)出願日	平成8年(1996)2月14日		東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
(31)優先権主張番号	特願平2-33852	(72)発明者	菅原 民雄
(32)優先日	平2(1990)2月16日		兵庫県三田市武庫が丘2丁目9番12号
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(72)発明者	岩沢 博行
			千葉県流山市江戸川台東3丁目1592-111
		(72)発明者	入江 邦彦
			東京都板橋区舟渡2丁目12-3-408
		(72)発明者	吉川 剛兆
			千葉県流山市平方字下台1232-2 ベルク
			レール江戸川台207
		(74)代理人	弁理士 津国 敦 (外1名)
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 グリコシルー蛋白誘導体

(57)【要約】

【課題】 薬剤を標的組織特に骨髄又は脳に選択的に運搬させるための担体として有用なグリコシルー蛋白誘導体を提供する。

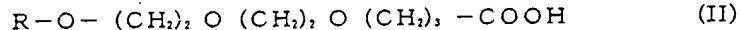
【解決手段】 式: $[R-X-]_m-Z$

(式中、Rはグリコシル基を表し、XはO- $(CH_2)_2$, O $(CH_2)_2$, O $(CH_2)_3$ -COを表し、Zは蛋白を表し、mは10~50を表す) で示されるグリコシルー蛋白誘導体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式: $[R-X-]_m-Z$
 (式中、Rはグリコシル基を表し、XはO- $(CH_2)_n$ 、
 O- $(CH_2)_n$ 、O- $(CH_2)_n$ 、-COを表し、Zは蛋白を表
 し、mは10~50を表す) で示されるグリコシル-蛋白
 誘導体。

【請求項2】 グリコシル基が、キシロビラノシリル基、
 マンノビラノシリル基、フコビラノシリル基、ガラクトビラ
 ノシリル基、2-アセトアミド-2-デオキシフコビラ
 ノシリル基、2-アセトアミド-2-デオキシ-マンノビラ
 ノシリル基、2-アセトアミド-2-デオキシ-ガラク
 トビラノシリル基、マンノビラノシリル-マンノビラノシリ
 ル基、(2-アセトアミド-2-デオキシ-マンノビラ
 ノシリル) -マンノビラノシリル基、(2-アセトアミド-2
 -デオキシ-グルコビラノシリル) -マンノビラノシリル
 基、フコビラノシリル(2-アセトアミド-2-デオキ
 シ-グルコビラノシリル) 基、ガラクトビラノシリル(2
 -アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシリル)



(式中Rはグリコシル基を表す) で示されるグリコシル
 -エチレンオキシドカルボン酸又はその誘導体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、薬物を標的組織特
 に骨髄又は脳に選択的に運搬させるための担体として有用
 なグリコシル-蛋白誘導体及びその中間体に関する。

【0002】

【従来の技術】骨髄組織は、赤血球、リンパ球、単球、
 顆粒球を作り出す組織であり、体内的造血、免疫を担う
 最も重要な組織である。ガン患者における放射線治療及び
 抗癌剤投与によって、骨髄機能低下が起こることは、
 現在避けることのできない副作用であり、骨髄抑制が起
 った結果、白血球や血小板の大幅な減少、特に顆粒球の
 減少に伴った重症感染症は大きな問題となっている。

【0003】また、脳組織へ薬剤が輸送されるためには
 血液脳関門を通過しなければならないため、脳内への薬
 剤の移行を妨げている。このため、脳内への薬剤の運搬
 手段の開発が要望されている。

【0004】一方、近年の免疫学の発展に伴い、多くの
 生理活性蛋白が単離精製され、その薬理作用についても
 明らかにされてきている。更に遺伝子工学技術の発展に
 伴い、多くのサイトカイン類、例えば赤血球の造血ホル
 モンであるエリスロポエチン、白血球の造血因子である
 数種類のコロニー刺激因子(CSF)、更に α -、 β -、 γ -インターフェロン、インターロイキン2等が、
 大量生産できるようになり、医薬品への応用が試みられて
 きている。

【0005】しかしながら、多くのサイトカイン類は、
 生体内に投与した後、すばやく代謝されてしまうため、
 目的とする組織での薬効発現が十分に達成できない問題

基、ガラクトビラノシリル(2-アセトアミド-2-デ
 オキシ-マンノビラノシリル) 基、ガラクトビラノシリル
 グルコビラノシリル基、ジ(2-アセトアミド-2-デオ
 キシ-グルコビラノシリル) -マンノビラノシリル基又はジ
 (ガラクトビラノシリル) -2-アセトアミド-2-デオ
 キシ-グルコビラノシリル基である、請求項1記載のグリ
 コシル-蛋白誘導体。

【請求項3】 蛋白が、アルブミン、サイトカイン類又
 は酵素である、請求項1又は2記載のグリコシル-蛋白
 誘導体。

【請求項4】 請求項1~3のいずれか1項記載のグリ
 コシル-蛋白誘導体を含有する薬剤運搬担体。

【請求項5】 請求項1~3のいずれか1項記載のグリ
 コシル-蛋白誘導体を含有する骨髄への薬剤運搬担体。

【請求項6】 請求項1~3のいずれか1項記載のグリ
 コシル-蛋白誘導体を含有する脳への薬剤運搬担体。

【請求項7】 式:

点がある。

20 【0006】この問題点を解決するために、生理活性物
 質や合成医薬品を標的部位に運搬する担体として、抗
 体、糖蛋白、リボ蛋白、レクチン、ホルモン、リボソーム、
 デオキシリボ核酸、多糖類、合成ポリマー、ポリアミ
 ノ酸等、天然由来高分子、分子集合体及び合成ポリマ
 ーに至る広い範囲の物質が提案されている。

【0007】例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,
 1487-1491 (1987) には数種のサイトカイン類をポリエ
 チレングリコール等の合成ポリマーで修飾し、サイトカ
 イン類自身の活性を失うことなく生体内での半減期を延
 長させる研究が報告されている。

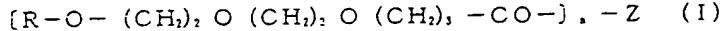
【0008】また、特開昭63-152393号公報には、糖鎖を有するポリエチレングリコール誘導体がサイトカイン類の修飾に用いることができ、この修飾蛋白は生体内におけるクリアランスを遅延させ、あるいは特定の細胞・組織への送達を向上させるために使用することが示唆されている。しかしながら、骨髄又は脳指向性に関する報告は存在しない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、骨髄又は脳
 細胞表面の糖認識性を利用し、薬物(サイトカイン類及
 び低分子の医薬品等)を標的組織である骨髄又は脳組織
 により多く送達することを可能とし、並びに薬物の生体
 内半減期を遅延させることを可能とする薬物運搬担体の
 発明であり、目的とする薬物を標的とする組織に送達す
 るシステム(Targeting Drug Delivery System)の開発
 を目的とするものである。

【0010】特に本発明は、再生不良性貧血等の造血機
 能の疾患、各種リンパ球疾患に伴う免疫不全症等の骨髄
 機能異常を起こしている患者、更には、骨髄性白血病、

ミエローム、形質細胞腫、多発性骨髄腫等の骨髄性ガン患者やガンの治療等に伴う副作用により骨髄機能低下を引き起こしている患者に対して、その治療に使われる薬物を効率よく骨髄組織に集めることによって、またその薬物の生体内半減期を遅延させることができる、より高い有効性が期待できる薬物運搬担体の開発を目的とするものである。



(式中Rはグリコシル基を表し、Zは蛋白を表し、mは5～50を表す)で示されるグリコシル-蛋白誘導体である。

【0013】本発明の上記化合物は、薬物を目的とする細胞、臓器、器官、特に骨髄又は脳組織への薬物運搬担体として利用することができる。薬物運搬担体は(i)

生体適合性が良いこと、(ii)投与後、一定時間は安定であること、(iii)薬物が作用部位に到達したとき化学的、酵素的反応により薬物が遊離されること、が要求される。

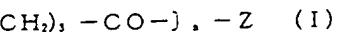
【0014】上記式の運搬担体を構成する糖鎖は、標的とする細胞臓器、器官等を特異的に認識する能力を持つた標的識別部位として利用することができる。Rで示されるグリニシル基としては、キシロビラノシル基、マンノビラノシル基、フコビラノシル基、2-ガラクトビラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシ-フコビラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシ-マンノビラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシ-ガラクトビラノシル基のような单糖類；マンノビラノシル-マンノビラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシ-マンノビラノシル) - マンノビラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシル) - マンノビラノシル基、フコビラノシル- (2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシル) 基、ガラクトビラノシル- (2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシル) 基、ガラクトビラノシル- (2-アセトアミド-2-デオキシ-マンノビラノシル) 基、ガラクトビラノシル-グルコビラノシル基のような二糖類又はジ(2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシル) - マンノビラノシル基、ジ(ガラクトビラノシル) - 2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシル基のような三糖類を挙げることができる。特に好ましくは、マンノビラノシル基、フコビラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシ-フコビラノシル基、マンノビラノシル-マンノビラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコビラノシル) - マンノビラノシル基、及びガラクトビラノシル-グルコビラノシル基が挙げられる。

【0015】式(I)の化合物において、糖鎖と蛋白を結ぶ修飾剤のジオキサカルボン酸はエチレン基又はプロピレン基を介したジオキサアルカン酸であり、好ましくは5, 8-ジオキサデカン酸である。糖鎖とジオキサカル

【0011】また、本発明は、アルツハイマー病等の治療のため、脳内への直接的な薬剤運搬担体の開発を目的とするものであり、これにより少量の薬剤であっても、その活性を保持したまま、かつ副作用の可能性を少なくてして治療を可能にする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、式：



ルボン酸との結合は α -結合でも β -結合でもよい。Zの蛋白としては、ヒト血清アルブミンのような蛋白であ

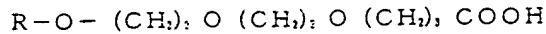
10 以外に、それ自体生理活性蛋白であるサイトカイン類のインターロイキン、ニリスロポエチン、インターフェロン、組織プラスミノーゲンアクチベーター、潰瘍壞死因子(TNF)又はコロニー刺激因子(CSF)であつてもよい。これらの蛋白自体は臓器特異性を持たないが、標的識別能力を持つ糖鎖で化学修飾することにより標的識別性を有するものになる。

【0016】式(I)の運搬担体を製造するには、例えばグリコシル-ジオキサアルカン酸のアルキルエステル又は2-アセトアミド-2-デオキシ-グリコシル-ジ20 オキサアルカン酸のアルキルエステルにヒドラジンを反応させ、得られた酸ヒドラジドを常法で酸アジドに変換し、これを蛋白と反応させてグリコシル-ジオキサアルカン酸が蛋白中のアミノ基の一部とアミド結合した目的物を得る。修飾基の結合数は蛋白1分子当たり5～50モルである。修飾の程度は、蛋白に対するグリコシル-ジオキサアルカン酸のモル比を増減するか、又は蛋白とグリコシル-ジオキサアルカン酸の反応液濃度を増減することによって選択することができる。

【0017】反応に用いる溶媒は反応を妨害しないもの30 であればいずれでもよいが、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等が挙げられる。反応は中性付近で0℃～室温で行われる。反応液は透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等の通常の蛋白の精製法により精製して目的物を得る。修飾基の導入数は、修飾蛋白を塩酸で加水分解後エルソン-モーガン法等で測定することにより知ることができる。

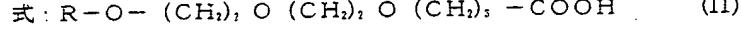
【0018】グリコシル-ジオキサアルカン酸と蛋白との反応は、水溶性カルボジイミド等の縮合剤の存在下に反応させることによっても製造することができる。また40 ジオキサアルカン酸の他の活性誘導体を用いてもよく、そのような活性誘導体としては、アミド化合物、活性エステル、活性チオエステル等が挙げられる。これらの活性誘導体は蛋白とアミド結合を形成させるために当業者において適宜選択することができる。

【0019】本発明はまた、式(I)の薬物運搬担体を50 製造するための中間体に関し、中間体は式(II)で示されるグリコシル-ジオキサカルボン酸又はその活性誘導体である。



ここに、Rは特にキシロピラノシル基、フコピラノシル基、ガラクトピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシーフコピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシーマンノピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシーガラクトピラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシーマンノピラノシル) -マンノピラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシーグルコピラノシル) -マンノピラノシル基、フコピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシーグルコピラノシル) 基、ガラクトピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシーグルコピラノシル) 基、ガラクトピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシーマンノピラノシル) 基、ガラクトピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシーグルニピラノシル) 基、ジ

(2-アセトアミド-2-デオキシーグルコピラノシル)



の中間体から以下の反応式に示す方法により製造することができる。

ル) -マンノピラノシル基又はジ(ガラクトピラノシル) -2-アセトアミド-2-デオキシーグルコピラノシル基のようなグリニシル基である。

【0020】式(II)の中間体を製造するには、(A)ヒドロキシル基を保護したグリコシルハライドに α -ヒドロキシジオキサアルカン酸アルキルエステルを反応させて、グリコシル- α (又は β) -ジオキサアルカン酸アルキルニステルとし、これを脱保護して得られるか、

(B) また2-アセトアミド-2-デオキシーグリコシル-ジオキサアルカン酸アルキルエステルは対応する2-アジド-2-デオキシーグリコシル-ジオキサアルカン酸アルキルエステルをアセチル化して得られる。更に必要により他の活性誘導体に導くことができる。

【0021】式(I)の遮蔽担体を製造するには、



【化1】

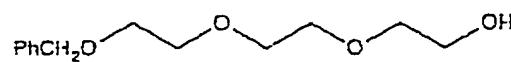
7

8

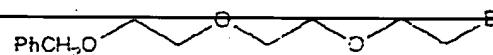


401

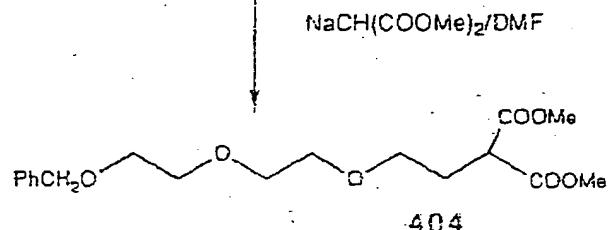
i. NaH/DMF

ii. PhCH₂Br

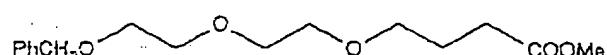
402

PBr₃

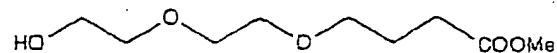
403



404

DMSO-H₂O-NaCl

405

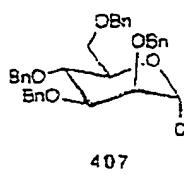
H₂-10%Pd/C

406

【0023】

【化2】

9

 $\text{As}_2\text{CO}_3, \text{CaSO}_4$

406

409

409

408

408

410

【化3】

【0024】

+

406

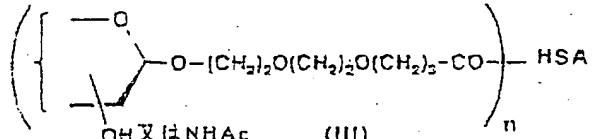
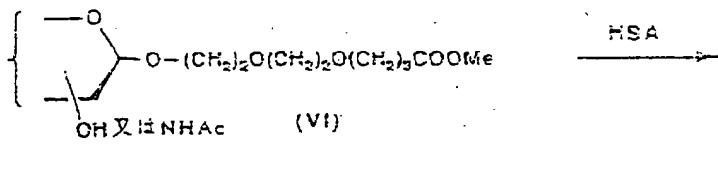
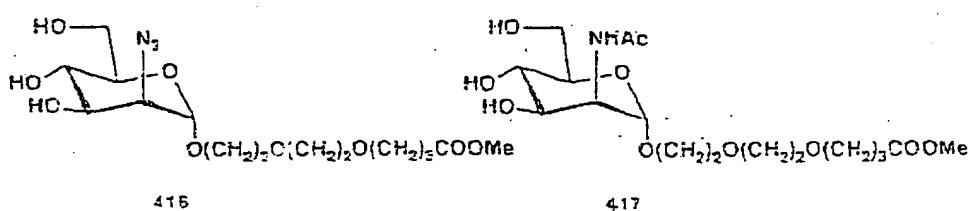
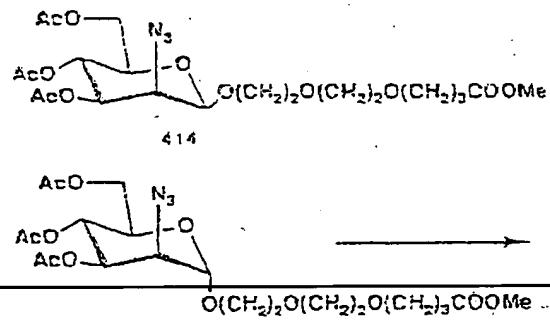
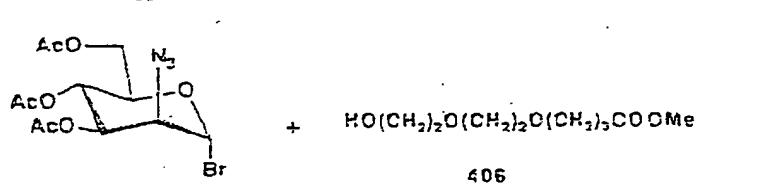
410

412

413

【化4】

【0025】



【0026】

【発明の効果】本発明のグリコシルー蛋白誘導体は、後記試験例に示すように薬剤を結合させ、これを試験例に示すように動物に投与したとき、薬剤を骨髓又は脳組織に集中的に分布させることができる。

【0027】

【実施例】以下に本発明の例及び試験例を示す。

【0028】例 1

2-(2-ベンジルオキシエトキシ)エトキシエタノール (402)

無水ジメチルホルムアミド 300 ml に 6.0% 水素化ナトリウム 13.5 g (0.338 モル) を懸濁させた溶液に、トリエチレングリコール (401) 50.0 g (0.33 モル) を滴下した。

室温で 1 時間攪拌した後に、臭化ベンジル 56.0 g (0.33 モル) を滴下

し、更に室温で 1 時間攪拌した。反応終了後減圧にて溶媒を留去し、得られた残留物を酢酸エチル 200 ml に溶解し、水 200 ml で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、これを減圧下濃縮乾固すると油状粗生成物が得られた。これをシリカゲルカラムクロマトグラフイー [シリカゲル 70-230 メッシュ 500 g、溶媒系：ヘキサン/酢酸エチル (1:1)] で精製すると、標記化合物 (402) が 27.5 g (34%) 得られた。

10 【0029】¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 7.26 ~ 7.35 (5H, m), 4.57 (2H, s), 3.73 (2H, t, J=4.5Hz), 3.66 ~ 3.71 (6H, m), 3.63 ~ 3.65 (2H, m), 3.62 (2H, t, J=4.5Hz), 2.25 (1H, br)

IR(neat) cm⁻¹ : 3450(OH), 1099(C-O-C)

【0030】例 2

2-(2-ベンジルオキシエトキシ)エトキシエチルブロミド (403)

化合物 (402) 36.0 g (0.15モル) の無水ニテル 100 ml 溶液に、氷冷下に三臭化リン 14.0 g (0.052モル) を加えて1時間攪拌した。更に1時間室温にて攪拌後、反応液に水 100 ml を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮乾固するとシロップ状の粗生成物が得られた。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 70-230メッシュ 250 g、溶媒系: ヘキサン/酢酸エチル (9:1)) で精製すると、標記化合物 (403) が 13.6 g (36%) 得られた。

【0031】¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 7.26 ~ 7.35 (7H, m), 4.58 (2H, s), 3.81 (2H, t, J=7.0Hz), 3.66 ~ 3.71 (6H, m), 3.61 ~ 3.63 (2H, m), 3.47 (2H, t, J=6.7Hz)

IR(neat) cm⁻¹ : 1112 (C-O-C)

【0032】例 3

メチル 4-[2-(2-ベンジルオキシエトキシ)エトキシ]-2-メトキシカルボニルブチノエート (404)

6.0%水素化ナトリウム 13.0 g (0.25モル) の無水ジメチルホルムアミド 300 ml 懸濁液に、マロン酸ジメチル 33.0 g を加えて、40℃で1時間攪拌した。これに化合物 (403) 41.1 g (0.136モル) を一度に加えて、更に40℃で6時間攪拌後、室温で一晩放置した。反応混合物を10%塩酸で中和し、溶媒を減圧下に留去して得られた残留物を水 100 ml 及び酢酸エチル 200 ml で分配した。有機相を分離後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を留去するとシロップ状の粗生成物が得られた。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 70-230メッシュ 250 g、溶媒系: ヘキサン/酢酸エチル (20:1)) で精製すると、標記化合物 (404) が 36.8 g (77%) 得られた。

【0033】¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 7.26 ~ 7.34 (5H, m), 4.56 (2H, s), 3.72 (3H, s), 3.52 (2H, t, J=5.9Hz), 2.18 (2H, m)

IR(neat) cm⁻¹ : 1754 (C=O), 1735 (CO₂CH₃)

【0034】例 4

メチル 4-[2-(2-ベンジルオキシエトキシ)エトキシ]ブチノエート (405)

化合物 (404) 23.2 g (65.5ミリモル) 及び塩化ナトリウム 4.5 g (76.9ミリモル) を水 4 ml とジメチルスルホキシド 80 ml の混合液に加え、150 ~ 160℃で4時間加熱攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下に留去し、得られた残留物を水 100 ml 及び酢酸エチル 100 ml で分配し、有機相を分離後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下に留去して得られたシロップ状の粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 70-230メッシュ 250 g、溶媒系: ヘキサン/酢酸エチル (2:3)) にて分離精製すると標記化合物 (409) 52.0 mg (81.2%) 及び標記化合物 (408) 12.0 mg (18.8%) が得られた。

系: ヘキサン/酢酸エチル (5:1) で精製すると、標記化合物 (405) が 17.0 g (87%) 得られた。

【0035】¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 7.24 ~ 7.33 (5H, m), 4.57 (2H, s), 3.66 (3H, s), 3.63 ~ 3.68 (6H, m), 3.57 ~ 3.58 (2H, m), 3.50 (2H, t, J=6.2Hz), 2.42 (2H, t, J=7.3Hz), 1.90 (2H, m)

IR(neat) cm⁻¹ : 1738 (CO₂CH₃), 1113 (C-O-C)

【0036】例 5

メチル 4-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]ブタノエート (406)

化合物 (405) 16.6 g (56.0ミリモル) のメタノール 20 ml 溶液に、10%パラジウム炭素 2.0 g を加え、室温にて4時間水素添加した。反応終了後、溶媒をろ過し、ろ液を減圧下に濃縮乾固すると、無色油状物の標記化合物 4.06 が 11.3 g (99%) 得られた。

【0037】¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 3.73 (2H, t, J=4.5Hz), 3.68 (3H, s), 3.65 ~ 3.68 (2H, m), 3.57 ~ 3.63 (4H, m), 3.51 (2H, t, J=6.2Hz), 2.42 (2H, t, J=7.3Hz), 1.92 (2H, m), 1.70 (1H, br)

IR(neat) cm⁻¹ : 3450 (OH), 1738 (CO₂CH₃), 1119 (C-O-C)

MS (EI) m/z : 207 (M-H⁺)

【0038】例 6

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシエトキシ]エチル-2,3,4,6-テトラ-O-ベンジル-β-D-マンノピラノシド (409) 及び 2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシエトキシ]エチル-2,3,4,6-テトラ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシド (408)

化合物 (406) 57.7 mg (2.8ミリモル)、炭酸銀 50.0 mg (1.79ミリモル) 及びドライライト 500 mg の塩化メチレン 5 ml 溶液を窒素気流下 0℃にて30分間攪拌した後、Koto, Morishima, Miyata, and Zen, Bull. Chem. Soc. Jpn., 49, 2639 (1976) の方法で得た、2,3,4,6-テトラ-O-ベンジル-α/β-マンノピラノシル p-ニトロベンゾエートの塩化メチレン溶液に、乾燥塩化水素ガスを吹き込んで合成した 2,3,4,6-テトラ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシルクロリド (407) 58.0 mg (0.84ミリモル) の塩化メチレン溶液 3 ml をゆっくり滴下した。その後、内温 0 ~ 5℃にて4時間攪拌した。反応終了後反応物をセライトを用いてろ過し、不溶物を塩化メチレンでよく洗浄した。ろ液及び洗液を合し、溶媒を減圧下留去すると粗生成物 1.1048 g が得られた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル 230 ~ 400 メッシュ 60 部、溶媒系: 酢酸エチル/ヘキサン (2:3)) にて分離精製すると標記化合物 (409) 52.0 mg (81.2%) 及び標記化合物 (408) 12.0 mg (18.8%) が得られた。

50.0 mg (18.8%) が得られた。

【0039】化合物(409)

[α]_D²⁴ - 44.6° (C 0.67, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 7.18~7.50 (20H, m, aromatic H), 4.85~4.97 (2H, AB-_q, J=12.5Hz, benzyl-CH₂), 4.54~4.62 (2H, AB-_q, J=12Hz, benzyl-CH₂), 4.50~4.90 (2H, AB-_q, J=12Hz, benzyl-CH₂), 4.41~4.51 (2H, AB-_q, J=12Hz, benzyl-CH₂), 4.44 (1H, s, H-1), 4.02~4.08 (1H, m, H-2), 3.64~3.93 (7H, m), 3.63 (3H, s, CO₂CH₃), 3.40~3.64 (8H, m), 2.35~2.40 (2H, m, CH₂CO-), 1.80~1.95 (2H, m, CH₂CH₂CO-)

IR (CHCl₃) cm⁻¹ : 1726 (CO₂CH₃)MS (FAB) m/z : 751 (M+Na⁺), 727 (M-1)

【0040】化合物(408)

[α]_D²⁴ + 13.9° (C 0.70, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 7.18~7.50 (20H, m, aromatic H), 4.91 (1H, d, J=1.71Hz, H-1), 4.68~4.75 (2H, AB-_q, J=12.5Hz, benzyl-CH₂), 4.604 (2H, s, benzyl-CH₂), 4.47~4.86 (2H, AB-_q, J=10.75Hz, benzyl-CH₂), 4.51~4.65 (2H, AB-_q, J=12Hz, benzyl-CH₂), 3.65~4.00 (8H, m), 3.63 (3H, s, CO₂CH₃), 3.44~3.60 (8H, m), 2.30~2.40 (2H, m, CH₂CO-), 1.80~1.90 (2H, m, CH₂CH₂CO-)

IR (CHCl₃) cm⁻¹ : 1725 (CO₂CH₃)

MS (FAB) m/z : 727 (M-1)

【0041】例 7

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシ)エトキシ]エチル- β -D-マンノピラノシド(410)

化合物(409) 500mg (0.686ミリモル)をメタノール10mlに溶解し、10%パラジウム-炭素500mgを加えて、水素気流下室温にて激しく40時間攪拌した。反応終了後触媒をろ去し、ろ液を減圧下濃縮乾固すると、標記化合物(410) 232.4mg (92%)が得られた。

【0042】化合物(410)

[α]_D²⁴ - 22.3° (C 2.18, MeOH)

¹H-NMR (CD₃OD, δ ppm) : 4.53 (1H, s, H-1), 3.30~4.00 (14H, m), 3.62 (3H, s, CO₂CH₃), 3.10~3.25 (2H, m), 2.37 (2H, t, J=7.3Hz, CH₂CO-), 1.83 (2H, t, J=7.3Hz, CH₂CO-)

IR (CHCl₃) cm⁻¹ : 3350 (OH), 1732 (CO₂CH₃)MS (FAB) m/z : 391 (M+Na⁺)

【0043】例 8

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロキシオキシ)エトキシ]エチル-2,3,4-トリ-O-アセチル- β -L-フコピラノシド(412)

H. M. Flowersらの方法 [Carbohydr. Res., 4, 189-195 (1967)]により調製した2,3,4-トリ-O-アセチル- β -L-フコピラノシルプロマイド(411) 1.66mg (0.469ミリモル)のベンゼン10ml溶液に化合物(406) 100mg (0.485ミリモル)、シア

ン化第二水銀123mg (0.485ミリモル)及び粉末化した無水硫酸カルシウム350mgを加え、アルゴン気流中室温で24時間攪拌した。反応溶液をろ過後、ろ液に酢酸エチル5mlを加え、水5mlで洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮して得られたシロップをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=200:1)で精製すると標記化合物(412)が136mg (58.6%)得られた。

【0044】化合物(412)

10 [α]_D²⁴ - 2.9° (C 1.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 1.22 (3H, d, J=6.4Hz, H-6), 1.99, 2.06, 2.18 (9H, 3s, OAc), 2.42 (2H, t, J=7.3Hz, CH₂COOCH₃), 3.68 (3H, s, OCH₃), 4.76 (1H, d, J=8.1Hz, H-1)

IR (NaCl) cm⁻¹ : 1750, 1700

【0045】例 9

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシ)エトキシ]エチル-2,3,4- β -L-フコピラノシド(413)

化合物(412) 180mg (0.376ミリモル)をメタノール2mlに溶解させた後、28%ナトリウムメチラート0.05mlを加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液をアンバーライトIR-120B (H⁺)で中和し、イオン交換樹脂をろ取した後、ろ液を減圧濃縮すると標記化合物(413)が109mg (82.3%)得られた。

【0046】[α]_D²⁴ - 2.1° (C 1.3, MeOH)

¹H-NMR (CD₃OD, δ ppm) : 1.23 (3H, d, J=6.6Hz, H-6), 2.37 (2H, t, J=7.6Hz, CH₂COOCH₃), 3.67 (3H, s, OCH₃), 4.19 (1H, d, J=7.3Hz, H-1)

IR (NaCl) cm⁻¹ : 3450, 1740, 1070

【0047】例 10

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシ)エトキシ]エチル-3,4,6-トリ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- α -D-マンノピラノシド(414)及び2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシ)エトキシ]エチル-3,4,6-トリ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- β -D-マンノピラノシド(415)

Carbohydr. Res., 136, 153 (1985)の方法で合成した

3,4,6-トリ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- α -D-マンノピラノシルプロマイド930mg (2.35ミリモル)とメチル-4-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]ブタノエート(406) 4.85mg (2.35ミリモル)のトルエン20ml溶液に、銀シリケート700mg及び粉末状モレキュラーシーブ4Aを500mg加え、室温で16時間攪拌した。反応溶液をセライトを用いてろ過した後、ろ液を減圧下に濃縮乾固し、得られた残渣をローバーカラム(ヘキサン:酢酸ニトリル=1:1)で精製すると標記化合物(414) 525mg (43%)及び標記化合物(415) 143mg

(11. 7 %) が得られた。

【0048】化合物 (414)

$[\alpha]_D^{25} = 58.2^\circ$ (C 0.57, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 5.39 (1H, dd, J_{1,2}=10Hz, J_{1,3}=4.0Hz, H-3), 5.32 (1H, t, J=10Hz, H-4), 4.91 (1H, s, H-1), 4.25 (1H, dd, J_{1,2}=4.5Hz, J_{1,3}=12Hz, H-6a), 4.02 (1H, m, H-5), 2.40 (2H, t, J=7.5Hz, -CH₂CO-), 2.10, 2.09, 2.04 (each 3H, each s, 3 × OAc)

IR (film) cm⁻¹ : 2110, 1747, 1438, 1369, 1230, 1049

【0049】化合物 (415)

$[\alpha]_D^{25} = 60.1^\circ$ (C 0.9, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) : 5.24 (1H, t, J_{1,2}=9.5Hz, H-4), 4.99 (1H, dd, J_{1,2}=3.5Hz, H-3), 4.79 (1H, s, H-1), 4.25 (1H, dd, J_{1,2}=5.5Hz, J_{1,3}=12Hz, H-6a), 4.00 (1H,

m, H-5), 2.40 (2H, t, J=7.5Hz, -CH₂CO-), 2.10, 2.08, 2.03 (each 3H, each s, 3 × OAc)

IR (film) cm⁻¹ : 2112, 1743, 1371, 1236, 1055

【0050】例 11

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシ)

エトキシ]エチル 2-アジド-2-デオキシ- α -D-マンノピラノシド (416)

化合物 (415) 525mg (1.01ミリモル) の無水メタノール 10ml溶液に、1M ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 0.25mlを加え、室温に4時間放置した。反応液にイオン交換樹脂アンバーライト IR-120B (H⁺型) を加えて中和した後、樹脂をろ去し、少量のメタノールで洗浄した。ろ液及び洗浄液を合し、減圧下で溶媒を留去すると、シロップ状の標記化合物 (416) 154mgが得られた。

【0051】例 12

2-[2-(3-メトキシカルボニルプロピルオキシ)

エトキシ]エチル 2-アセタミド-2-デオキシ- α -D-マンノピラノシド (417)

化合物 (416) 150mg (0.381ミリモル) のエタノール 4ml溶液に、塩化ニンケル六水和物 380mg (1.6ミリモル) をエタノール 10mlに溶解した液 0.1mlを加えた後、水素化ホウ素ナトリウム 43mg (1.143ミリモル) のエタノール溶液に 4mlを搅拌しながら加えた。室温で30分間搅拌した後、反応液に

表1

化合物	使用した中間体化合物	糖修飾アルブミン	n数
418	410	(Man α -O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ CO) _n -HSA	17
419	413	(Fuc β -O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ CO) _n -HSA	28
420	417	(ManNAc α -O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ CO) _n -HSA	40

酢酸を加えて中和した。次いで無水酢酸 0.5mlを加えて室温に1時間放置した。反応混合物を減圧下で濃縮乾固して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=7:1) で精製すると標記化合物 (417) が 157mgが得られた。

【0052】 $[\alpha]_D^{25} = 26.4^\circ$ (C 0.62, MeOH)

¹H-NMR (CD₃OD, δ ppm) : 4.72 (d, 1H, J=1Hz, H-1), 4.31 (dd, 1H, J_{1,2}=1Hz, J_{1,3}=4.7Hz), 2.01 (s, 3H, NAc)

IR (KBr) cm⁻¹ : 3446, 1730, 1660, 1550, 1132, 1068

10 【0053】例 13

ネオグリコプロテイン (419)

化合物 (413) 85mg (0.241ミリモル) のエタノール 0.8ml溶液に、ヒドロジンヒドарат 0.24mlを加え、室温で24時間搅拌した。反応溶液を減圧濃

縮した後、水 1mlを加え、更に減圧濃縮することにより 2-[2-(3-ヒドロジノカルボニルプロピルオキシ)エトキシ]ニチル β -L-フコピラノシド 85mgを得た。これにDMF 3mlを加えて溶解させ、-25°Cに冷却後、4N 塩化水素のジオキサン溶液 0.14mlを加えた。更に同温で亜硝酸t-ブチル 35.5mg (0.241ミリモル) のDMF 0.2ml溶液を加えて30分間搅拌した後、スルファミン酸 16.8mgのDMF 0.2ml溶液を加え、15分間搅拌することにより、対応する酸アジドを含む反応溶液を得た。これを0°Cに冷却した人血清アルブミン (HSA) 332mg (4.82 × 10⁻³ミリモル) のホウ酸緩衝液 (0.08M Na₂B₄O₇、0.35M KHCO₃) 20mlに加え、同温で24時間搅拌した。4°Cで一晩透析後、凍結乾燥することによりフコース修飾アルブミン (419) 343mgの粉末を得た。フェノール-硫酸法によりHSA/モルに結合した糖鎖のモル数は 28 であることがわかった。

【0054】ネオグリコプロテインと使用した中間体の一覧を表1に示した。導入された糖含量は、中性糖の場合にはフェノール-硫酸法により、ヘキソサミンの場合には4N 塩酸による加水分解後、エルソン-モーガン法で行った。またこれらのネオグリコプロテインの物理恒数を表2に示した。

【0055】

【表1】

表2

化合物	比旋光度 [α] _D ²⁴	赤外線吸収スペクトル IR(KBr) cm^{-1}
418	-57.1(c 0.56)	3300, 1660, 1540
419	-53.8(c 0.32)	3452, 1654, 1541
420	-44.2(c 0.20)	3317, 1657, 1539

【0057】試験例

ネオグリコプロテイン418、419及び420を検体試料として、またHSAを対照試料として用意した。下記方法により試料をヨードラベル化し、動物における分布実験を行った。

【0058】試験方法

各ネオグリコプロテインを、クロラミンT法を用いてヨードラベル化した。その結果、比活性18~30 MBq/ $20 \mu\text{g}$ 蛋白質のヨードラベル化ネオグリコプロテインを得た。放射性ヨードが蛋白に結合していることを確認するために、TCA処理を行った。即ち、0.5%牛の血清アルブミン含有0.1Mリン酸緩衝液を用いて適当に希釈した後、その $300 \mu\text{l}$ を試験管に取り、15%TCA(トリクロロ酢酸)溶液 $600 \mu\text{l}$ を加え、攪拌後 $3,000 \text{ rpm}$ で10分間遠心し、上清、沈殿中に存在する放射性ヨードの活性を測定した。その結果、全放射活性の95%以上が沈殿中に存在しており、放射性ヨードが蛋白に結合していることがわかった。

【0059】このヨードラベル化ネオグリコプロテインを用いて、動物における分布実験を行った。まず、ヨードラベル化ネオグリコプロテイン $4 \mu\text{g}$ を0.5%牛の血清アルブミン含有0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)1mlに溶解し、投与検液とした。またヨードラベルの比活性が高いときは、未標識のネオグリニプロテインを用いて希釈を行い、投与検液とした。

【0060】この溶液をSD系雄性ラット(体重240~300g)に、体重100g当り 0.1 ml になるよう、大腿静脈より投与した。その後、正確に1分、2分、3分後に頸静脈より採血を行い、投与後5分後に下大動脈より全身血を採取し脱血死させる。その後、直ちに心臓、肺臓、胸腺、脾臓、腎臓、筋肉、骨髄、皮膚、肝臓を採取した。

【0061】投与後1分、2分、3分、5分の血清及び

5分の全血液、心臓、肺臓、胸腺、脾臓、腎臓、筋肉、骨髄、皮膚、肝臓を正確に秤量し、その放射活性を測定した。

【0062】また、投与検液及び投与後5分の血清中に存在する放射活性が、ネオグリコプロテインに結合していることを確認するために、TCA処理を行った。操作は前述と同様を行い、全放射活性の90%以上がネオグリコプロテインに結合していることを確認した。

【0063】次に、得られた血清中濃度(投与後1分、2分、3分及び5分)の結果より、投与後0分から5分までの血清中濃度下面積(AUC₀₋₅)を台形近似法を用いて計算した。AUC₀₋₅は、次式により定義される。

$$AUC_{0-5} = \int_0^5 C dt$$

ここでCはネオグリコプロテインの時間(t)における血清中濃度である。

【0064】更に、ネオグリコプロテインの各組織中濃度とAUC₀₋₅の比から、組織分布クリアランスを計算した。その結果を表3に示した。

【0065】このことは、グリコシルー蛋白誘導体は骨髓組織を標的組織とする薬物運搬担体として有用であることを示している。

【0066】

【表3】

表3

化合物	骨髓分布クリアランス ml/min/g tissue
418	0.0367
419	0.0467
420	0.0205
HSA	0.0168

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

C 07 K 14/52

識別記号

府内整理番号

F I

A 61 K 37/48

技術表示箇所

(72) 発明者 奥野 哲

埼玉県三郷市早稲田8-5-18

(72) 発明者 加藤 隆

千葉県柏市東1-7-1 グランドール亞
梨104